

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional**



**(43) Fecha de publicación internacional  
2 de Junio de 2005 (02.06.2005)**

**PCT**

**(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2005/049076 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>:  
**A61K 39/095, A61P 31/04**

(21) Número de la solicitud internacional:  
**PCT/CU2004/000014**

(22) Fecha de presentación internacional:  
18 de Noviembre de 2004 (18.11.2004)

(25) Idioma de presentación:  
español

(26) Idioma de publicación:  
español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
**CU2003/0270**  
19 de Noviembre de 2003 (19.11.2003) CU

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA** [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán - Playa, La Habana 10600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **PAJÓN FEYT, Rolando** [CU/CU]; Calle 150 Nº 24312 entre 245 y 243, Bauta, La Habana 32400 (CU). **AGUILAR RUBIDO, Julio** [CU/CU]; Avenida 61 No. 7008 entre 70 y 72, Guanajay, La Habana 32200 (CU). **NIEBLA PÉREZ, Olivia** [CU/CU]; Calle 186 entre 31 y 33, Edificio 3115, Apto 9D, Playa, La Habana 12100 (CU). **CARMENATE PORTILLA, Tania** [CU/CU]; Calle Churrucá 387 entre Daoiz y Santa Teresa, Cerro, La Habana 12000 (CU). **GONZALEZ BLANCO, Sonia** [CU/CU]; Calle 184 entre 31 y 33A Edificio 3112 Apto 42, Playa, La Habana 12100 (CU). **SARDÍNAS GARCÍA, Gretel** [CU/CU]; Jorge No. 18 entre Espadero y Freyre D'Andrade, Reparto Sevillano, Municipio 10 de Octubre, La Habana 10500 (CU). **DELGADO ESPINA, Maite** [CU/CU]; Calle 186 entre 31 y 33A, Edificio 3112 Apto 10, Cubanacán - Playa, La Habana 12100 (CU).

(74) Mandatario: **POVEDA MARCHECO, Argia**; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán - Playa, La Habana 10600 (CU).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*[Continúa en la página siguiente]*

**(54) Title: USE OF CAPSULAR *NEISSERIA MENINGITIDIS* POLYSACCHARIDES AS MUCOSAL IMMUNOPOTENTIATORS AND RESULTING FORMULATIONS**

**(54) Título: POLISACÁRIDOS CAPSULARES DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* COMO INMUNOPOTENCIADORES MUCOSALES Y FORMULACIONES RESULTANTES**

**A1**  
**WO 2005/049076 A1**

(57) Abstract: The invention relates to the use of capsular polysaccharides of different *Neisseria meningitidis* serogroups as immunopotentiating and immunomodulating agents which can be used to develop vaccines. According to the invention, the polysaccharides are administered in order to increase the immune response to heterologous antigens that have been co-administered mucosally. In this way, multiple formulations comprising capsular *N. meningitidis* polysaccharides and heterologous antigens are obtained, which, when administered mucosally, produce immunogenicity levels similar to those obtained following the parenteral administration of similar combinations. Using the aforementioned polysaccharides as immunopotentiators dispenses with the use of other mucosal adjuvants. Said novel use of capsular *N. meningitidis* polysaccharides and the resulting antigen formulations are suitable for use in the pharmaceutical industry as preventive or therapeutic vaccine formulations.

(57) Resumen: Uso de polisacáridos capsulares de distintos serogrupos de *Neisseria meningitidis*, como agentes inmunopotenciadores e inmunomoduladores, útiles para el desarrollo de vacunas. En la presente invención se administran dichos polisacáridos para incrementar la respuesta inmune contra antígenos heterólogos que han sido coadministrados por la vía mucosal. Se obtienen formulaciones múltiples de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* y antígenos heterólogos que al ser administradas por vías mucosales, producen niveles de inmunogenicidad similares a los obtenidos después de la administración parenteral de combinaciones similares. El uso de dichos polisacáridos como inmunopotenciadores permite prescindir del empleo de otros adyuvantes mucosales. Este nuevo uso de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* y las formulaciones antigenicas resultantes son aplicables en la industria farmacéutica como formulaciones vacunales preventivas o terapéuticas.



**Publicada:**

- *con informe de búsqueda internacional*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

## MEMORIA DESCRIPTIVA

**POLISACÁRIDOS CAPSULARES DE *Neisseria meningitidis*  
COMO INMUNOPOTENCIADORES MUCOSALES Y FORMULACIONES  
5 RESULTANTES.**

La presente invención se relaciona con el campo de las vacunas, específicamente, con el desarrollo de inmunopotenciadores y formulaciones vacunales.

El objetivo de la invención es el uso de polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciadores que favorecen el incremento de la respuesta inmune contra los antígenos coadministrados en formulaciones vacunales por vía mucosal y dichas formulaciones.

En este sentido, se plantea la obtención de formulaciones vacunales múltiples para administración mucosal, que tienen como inmunopotenciadores los polisacáridos capsulares de la *Neisseria meningitidis*, y combinaciones de ellos, específicamente los polisacáridos capsulares pertenecientes a los serogrupos A y/o C, capaces de potenciar la inmunogenicidad de los antígenos contenidos en las mismas, luego de la coadministración por vía mucosal de los antígenos de interés descritos en las formulaciones objeto de esta invención.

Las formulaciones de la presente invención son formulaciones multivalentes que contienen al polisacárido A, al polisacárido C, o a ambos, como inmunoestimuladores o inmunomoduladores, y a otros antígenos, entre ellos, antígenos solubles como los toxoides, sus conjugados, preparados de membrana externa, así como microorganismos de interés vacunal inactivados o atenuados.

Otros antígenos comercialmente disponibles, utilizados rutinariamente en la inmunización, se han usado en el tipo de formulaciones nasales que aquí se describen. Con ellos se han obtenido idénticos resultados y niveles de inmunogenicidad similares a los alcanzados luego de su administración parenteral en formulaciones convencionales. En este caso existe la ventaja adicional de que inducen una fuerte respuesta a nivel mucosal, al ser administradas por esa vía, lo que es una característica única de este tipo de formulaciones. Otro aspecto importante de estas formulaciones, es que permiten evadir el uso de otros adyuvantes mucosales, ya que en algunos casos los propios antígenos de la formulación, son los elementos capaces de favorecer el incremento de la respuesta para el resto de los otros antígenos coadministrados.

La generación de una potente respuesta inmune contra antígenos inoculados por vía mucosal es uno de los retos actuales de la investigación en el campo de las vacunas. Para patógenos que permanecen en las superficies mucosales o tienen en ellas una puerta de entrada, se ha demostrado la existencia de una respuesta local fuerte correlacionada con la protección contra los mismos (American Academy of Pediatrics. Cholera. Report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, 1991; IL, 170).

La inoculación mucosal de antígenos vacunales ofrece múltiples ventajas con respecto a las vacunas administradas por vía parenteral; entre ellas: el aumento de la seguridad y la disminución al mínimo de los efectos adversos (Typhoid vaccination: weighing the options. Lancet 1992; 340:341-2; Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants. Clin Infect Dis 2000; 30: S266-70), la reducción del personal calificado y de la logística de la vacunación, así como el incremento de la efectividad de la vacunación en ancianos y recién nacidos.

La inmunización mucosal, además, puede facilitar la erradicación de algunas enfermedades causadas por patógenos que permanecen colonizando asintomáticamente las superficies mucosales (Kraehenbuhl J P y Neutra M N. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev.* 1992; 72: 853-79). Esto se debe a que este tipo de inmunización no solo puede generar respuestas sistémicas, sino también mucosales, lo cual no se logra mediante las inoculaciones por la vía parenteral.

No obstante, unida a las ventajas previamente enumeradas, existe una posible desventaja desde el punto de vista del productor que es que la cantidad de antígeno requerida para las inmunizaciones mucosales puede ser mayor a la que se necesita para las inmunizaciones parenterales, probablemente, debido a varios factores tales como: la relativa ineficiencia de la entrada del antígeno intacto al tejido linfoide mucosal, la existencia de las barreras tanto acídica como proteolítica, el peristaltismo y los mecanismos de limpieza, entre otros. De aquí se deriva el necesario desarrollo de adyuvantes o estrategias de adyuvación para uso mucosal, que potencien la inducción de respuesta inmune (Faden H, et al. Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in childhood: systemic and local immune responses. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 1291-1297; Shahin RD, et al. Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 4063-4068).

Si bien existen varios sitios inductores de respuesta inmune mucosal, el más conveniente ha sido el NALT. La vacunación por vía nasal con vacunas vivas de influenza ha tenido buenos resultados en niños y adultos. Esta vía puede ser aplicable a otras vacunas sensibles a afectación producto de las condiciones gastrointestinales a que se enfrentan en casos de administración oral (Walker R I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994; 4:387-400).

Un adyuvante, por definición, es una sustancia que acelera, prolonga, o potencia la respuesta inmune específica contra los antígenos coadministrados por vía mucosal o parenteral (Vogel FR. Adjuvants in perspective. *Dev. Biol. Stand.* 1998; 92:241-248). Con su uso se genera o potencia el tipo de respuesta deseada y disminuye así el número de inoculaciones y la cantidad de antígeno necesaria para obtener y mantener una respuesta inmune protectora.

Entre los adyuvantes mucosales más estudiados se encuentran la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (CT), y la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT). La subunidad B de la CT (CTB) tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad epitelial a antígenos heterólogos administrados por vía nasal, no ocurriendo así para aquellos administrados oralmente (Lycke N, et al. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. Immunol.* 1991; 33: 691-698; Gizuranson S, et al. The effect of cholera toxin and cholera toxin B subunit on the nasal mucosal membrane. *Vaccine* 1991; 9: 825-832; Gizuranson S, et al. Stimulation of the transepithelial flux of influenza HA vaccine by cholera toxin B subunit. *Vaccine* 1992; 10:101-106).

Otra proteína utilizada como adyuvante mucosal en ratones, la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* obtenida de forma recombinante (rLTB), administrada por vía intranasal en ratones conjuntamente con DT, produjo una estimulación sustancial de anticuerpos IgG séricos específicos para el DT y una inducción moderada de respuestas de anticuerpos IgA específicos para el DT en las cavidades nasales y en los pulmones (Kozuka S, et al. Efficient extracellular

production of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit by using the expression/secretion system of *Bacillus brevis* and its mucosal immunoadjuvanticity. *Vaccine* 2000; 18:1730-1737).

Algunos adyuvantes usados por vía parenteral también han sido evaluados por vía mucosal; entre ellos: los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), las microcápsulas, los liposomas, el lisofosfatidil glicerol, la Avridina (una amina lipoidal), y las citoquinas (Ramsay AJ *et al.* Enhancement of mucosal IgA responses by interleukins 5 and 6 encoded in recombinant vaccine vectors. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 389-392; O'Hagan DT, *et al.* Vaginal immunization of rats with a synthetic peptide from human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Gen Virol* 1992; 73: 2141-2145).

En 1997 se realizó el primer estudio en humanos que demostró que la vacunación por la vía nasal con la subunidad B de la toxina colérica recombinante (rCTB) induce anticuerpos IgA e IgG específicos en las secreciones vaginales (Bergquist, C. *Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. Infect Immun.* 1997; 65:2676-2684). Además, la inmunización de animales por esta vía, ha generado una respuesta de IgA en secreciones vaginales, incluso mayor que la alcanzada en la inmunización por la vía intravaginal (Di Tommaso A *et al.* Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect. Immun.* 1996; 64: 974-979; Gallichan WS y Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995; 5:1589-1595; Hopkins S *et al.* A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* 1995; 63:3279-3286).

Todos los antígenos utilizados en esta invención tienen en común, entre otros aspectos, el que hayan sido ampliamente investigados con fines vacunales, incluso muchos de ellos utilizados por vía nasal. La administración conjunta del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) con la subunidad B de la toxina del cólera obtenida de forma recombinante a ratones por la vía nasal, genera no solo respuestas inmunes sistémicas contra el HBsAg, sino también mucosales (Isaka M. *et al.* Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 2001; 19:1460-1466).

Se ha encontrado que la administración de un polisacárido como el acemanano (un polímero acetilado de manosa, extraído de la planta *Aloe barbadensis* Miller) conjuntamente con el HBsAg por la vía nasal, genera una respuesta de anticuerpos IgG séricos similar a la obtenida con la administración del antígeno adyuvado con alúmina, así como una respuesta de IgA en secreciones vaginales, comparable con la obtenida tras la aplicación intranasal del HBsAg adyuvado con la CT (Aguilar JC, *et al.* WO 98/39032). En la literatura especializada se recogen también ejemplos de inmunización intranasal con toxoide diftérico (DT) y toxoide tetánico (TT), conjuntamente con rCTB, lo que ha resultado en la producción de anticuerpos séricos y en las mucosas de los animales inmunizados (Isaka M, *et al.* Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1999; 18:743-751; Isaka M, *et al.* Systemic and mucosal immune responses of mice to aluminium-adsorbed or aluminium-non-

adsorbed tetanus toxoid administered intranasally with recombinant cholera toxin B subunit. *Vaccine* 1998; 16:1620-1626).

Las reacciones inmunopatológicas asociadas a la administración intranasal con el adyuvante mucosal CT, estudiadas en ratones BALB/c (Simecka JW, *et al.* 5 *Mucosally induced immunoglobulin E-associated inflammation in the respiratory tract. Infect Immun.* 2000; 68:672-679) realzan la importancia que tiene el diseño racional de estrategias de inmunización que impliquen una economía de recursos. Entre otros, se destaca la necesidad de buscar alternativas mediante las cuales se sustituyan los adyuvantes tóxicos que se utilizan como modelos para estudiar la 10 inmunogenicidad y eficacia de las diferentes vías, pero cuyas combinaciones no son aplicables a humanos.

Como se aprecia, dentro de los inmunoestimuladores mucosales reportados en la literatura, a los cuales nos hemos referido, no se encuentran los polisacáridos capsulares del meningococo. *N. meningitidis* es el microorganismo causante de la 15 meningitis meningocócica. Se describe como un diplococo Gram negativo cuyo único hospedero es el hombre, siendo los niños menores de 2 años de edad la población más susceptible a contraer la enfermedad meningocócica provocada por este microorganismo. En el afán de obtener un preparado vacunal que satisfaga los requisitos necesarios para generar una respuesta inmune protectora contra este 20 patógeno se han desarrollado diversas estrategias, entre ellas el empleo de los polisacáridos capsulares como antígenos vacunales (Wong, V K, *et al.* *Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8: 224-227).

De esta manera, en la actualidad existen varias vacunas antimeningocócicas 25 basadas únicamente en los polisacáridos capsulares purificados de los serogrupos A, C, Y, y W135, o en sus combinaciones (Hart CA y Rogers TR. *Meningococcal disease. J Med Microbiol.* 1993; 39: 3-25). La primera vacuna polisacáridica contra *N. meningitidis* se logró a finales de los años sesenta (Gotschlich EC, *et al.* *Human 30 immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. J. Exp. Med.* 1969; 129: 1367-84). Estas vacunas, si bien inducen una inmunidad protectora, confieren protección serogrupo-específica y de corta duración. Además, son pobremente inmunogénicas en niños menores de 2 años, lo cual conlleva a esquemas complejos de inmunización. Solo en niños mayores de 18 meses se ha observado respuesta de 35 anticuerpos después de una sola dosis de vacunación (Käyhty H, *et al.* *Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A *Neisseria meningitidis* followed for three years in infants and children. J Infect Dis.* 1980; 142: 861-8). En estos preparados vacunales, se ha explotado solamente el polisacárido como antígeno, en ninguno de los casos como potenciador de la respuesta inmune, y 40 siempre por vía parenteral.

Con el objetivo de cambiar el carácter de estas vacunas polisacáridicas, de antígeno timo independiente a timo dependiente, y de generar una respuesta protectora en niños pequeños, se han acoplado los polisacáridos A y C a proteínas portadoras (Cruse S J y Lewis R E Jr. *Contemporary trends in conjugate vaccine development.* 45 *Contrib Microbiol Immunol* 1989; 10: 1-10). Estos conjugados proteína-polisacárido se han descrito como fuertes inmunógenos, capaces de inducir memoria cuando se administran en formulaciones convencionales por vía parenteral (Ceesay SJ, *et al.* *Decline in meningococcal antibody levels in African children 5 years after vaccination and the lack of an effect of booster immunization. J Infect Dis.* 1993; 167: 1212-6; 50 Anderson P, *et al.* *Priming and induction of *Haemophilus influenzae* type b capsular*

antibodies in early infancy by Dpo20, an oligosaccharide-protein conjugate vaccine. *J Pediatr.* 1987; 167: 644-50). Nuevamente, su uso se ha limitado a la búsqueda de respuesta inmune contra el polisacárido, sin explorarse su uso como inmunopotenciador por vía mucosal.

5 Durante el desarrollo de candidatos vacunales basados en determinantes proteicos como alternativa para la obtención de una vacuna efectiva contra el serogrupo B, varias vacunas basadas en complejos de membrana externa (OMP) han sido evaluadas extensivamente en animales y humanos. Varios de estos estudios han demostrado incluso que la inmunogenicidad de los preparados de OMP es

10 aumentada por adición de polisacárido B (Zollinger WD, et al. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J. Clin. Invest.* 1979; 63:836-848; Peppler MS y Frasch CE. Protection against group B *Neisseria meningitidis* disease: effect of serogroup B polysaccharide and polymyxin B on immunogenicity of serotype protein preparations.

15 *Infect Immun.* 1982; 37:264-270) o polisacárido C (Rosenqvist E, et al. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. *Dev Biol Stand* 1998; 92:323-33), limitándose siempre a la vía parenteral en estos estudios y mostrando solo aumentos significativos de la

20 respuesta inmune contra OMP cuando se utilizaba el polisacárido en conjunción con alúmina. Un estudio en voluntarios, comparando varias cantidades de OMP administradas por vía parenteral, en presencia de alúmina como adyuvante, reveló que solo la combinación de polisacárido C y alúmina era capaz de incrementar la inmunogenicidad del preparado en humanos cuando se comparaban globalmente.

25 Sin embargo, cuando las comparaciones se realizaron entre los individuos que recibieron la misma dosis de OMP, no fue posible establecer ninguna diferencia significativa entre los grupos inmunizados con OMP, OMP + Polisacárido C, y OMP + Polisacárido C + Alúmina (Rosenqvist E, et al. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. *Dev Biol Stand* 1998; 92:323-33).

30 Existen estudios donde se demuestra que la administración intranasal de OMP induce respuesta de anticuerpos séricos y mucosales, tanto en ratones (Saunders NB, et al. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infect Immun.* 1999; 67: 113-9), como en voluntarios sanos (Haneberg B, et al. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect Immun.* 1998; 66: 1334-41). Además, se ha demostrado respuesta celular tras la inmunización intranasal con dichos preparados en humanos (Oftung F, et al. Antigen-specific T-cell responses in humans after intranasal immunization with a meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun.* 1999; 67: 921-7). Sin embargo, en ninguno de estos reportes se ha planteado el uso de los polisacáridos capsulares de este microorganismo como adyuvantes mucosales.

35 40 45 50

Hasta el momento no existe ninguna referencia de estudio de combinaciones antigenicas para la administración nasal de OMP de *Neisseria*, DT, TT, HBsAg, antígenos de *Bordetella pertussis* (Bp), poliribosilribitol fosfato (PRP) u otros antígenos solubles o resultantes de un proceso de inactivación viral o bacteriano en la que se evidencie el efecto inmunopotenciador de los polisacáridos de *N. meningitidis* en dichas formulaciones.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se relaciona con el uso de polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* como inmunopotenciadores en inmunizaciones por vía mucosal, con las 5 formulaciones vacunales resultantes de la combinación de estos y otros antígenos vacunales que se benefician de esta propiedad; y con la aplicación de este uso de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* y de las formulaciones en el campo de las vacunas.

Se relaciona además con las formulaciones multivalentes, específicamente para 10 administración nasal, que resultan de la aplicación de esta propiedad de los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis*, favorecedora del incremento de la respuesta inmune a los otros antígenos presentes en las mismas.

Las formulaciones vacunales para administración nasal de la presente invención, 15 que involucran los polisacáridos capsulares de *N. meningitidis*, pueden contener uno o más antígenos proteicos de naturaleza soluble, que reciben un efecto inmunopotenciador por su coadministración con el polisacárido capsular de *N. meningitidis* en cuestión, tanto si es con el polisacárido C de *N. meningitidis*, con el polisacárido A de esta misma especie o con combinaciones de los mismos, y de otros polisacáridos capsulares de esta especie, en cantidades tales que ellos actúen 20 primariamente como inmunopotenciadores y/o inmunomoduladores de la respuesta generada contra el resto de los antígenos presentes en la formulación. Estos últimos pueden ser el toxoide tetánico, el diftérico o conjugados proteína – polisacárido de los mismos o de otras proteínas portadoras, cuya porción sacáridica se corresponde con un candidato vacunal anti-*Haemophilus influenzae* tipo b, polisacáridos A, C, Y, 25 W135, o cualquier otro de la cápsula de *N. meningitidis*, polisacáridos vacunales de *Streptococcus pneumoniae*, o en general una o más proteínas solubles de interés vacunal purificadas de su fuente natural u obtenidas de manera recombinante o sintética.

Es también un objeto de la presente invención las formulaciones multivalentes para 30 administración nasal en la que junto al polisacárido capsular de *N. meningitidis* se adiciona un candidato vacunal del grupo de los microorganismos inactivados y que recibe un efecto inmunopotenciador y/o inmunomodulador por su coadministración con el polisacárido C, el A o cualquier polisacárido capsular de *N. meningitidis* y/o combinación de los mismos. El antígeno vacunal puede ser la bacterina de Bp, que 35 recibe un efecto inmunopotenciador por su coadministración con el polisacárido de *N. meningitidis*, u otro antígeno vacunal de esta naturaleza sólo o formando parte de combinaciones complejas de antígenos.

Todos los antígenos utilizados en esta invención tienen en común, entre otros aspectos, el que hayan sido ampliamente investigados con fines vacunales, incluso 40 muchos de ellos utilizados por vía nasal. Sin embargo, aunque parezcan numerosos los estudios realizados, éstos han sido utilizados por la vía parenteral fundamentalmente y nunca antes han sido utilizados por vía nasal con los polisacáridos aquí mencionados.

Otros antígenos vacunales que pueden estar contenidos son los actuales candidatos 45 vacunales inactivados o atenuados. Las formulaciones vacunales para administración nasal relacionadas con la presente invención pueden contener un número variable de antígenos de microorganismos de especies diferentes desde 1 hasta 20, de naturaleza antigénica entre las descritas anteriormente, con un volumen final y cantidades de antígeno a inocular que están en el rango entre 50 µl y 2 ml, y

entre 0.01 µg y 3 mg, respectivamente, en dependencia del tamaño y la especie a inmunizar.

Las formulaciones de la presente invención pueden solubilizarse en PBS, solución salina, agua para inyecciones o en cualquier solución tampón de uso en la práctica médica y que permitan la estabilidad de los antígenos, en concentraciones que están en el orden de las posibles combinaciones de masa y volumen descritas con anterioridad.

También los componentes antigenicos pueden mezclarse con el polisacárido capsular de *N. meningitidis* de acuerdo al interés por edad de la población a vacunar o con candidatos multivalentes basados en cualquier otra premisa, donde estén representados uno, dos o más tipos antigenicos de los descritos previamente y que pueden estar en estado líquido y/o liofilizado y administrarse mediante gotas, spray o pulverización.

Las formulaciones vacunales de la presente invención se pueden utilizar para lograr una inmunización efectiva de humanos o animales de modo preventivo o terapéutico.

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Comparación de los títulos de IgG obtenidos contra el antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), cuando se coadministró con diferentes inmunopotenciadores: A. Alúmina, B. Acemananano (0.25 mg/ml), C. Acemanano (0.35 mg/ml), D. Polisacárido C, E. Quitosano, F. Dextrana, G. Levano, H. PBS. El resultado fue expresado como logaritmo de los títulos y las barras representan el valor de la media geométrica y los intervalos de confianza.

**Figura 2.** Niveles de anticuerpos IgG contra las proteínas de membrana externa (PME) de *Neisseria meningitidis*, obtenidos al inmunizar ratones con PME o combinada con el polisacárido C de la misma bacteria. A. PME, B. PME (s.c), C. PME + 5 µg de polisacárido C, D. PME + 50 µg de polisacárido C, E. 50 µg de polisacárido C, F. 50 µg de polisacárido C (s.c). Los inmunógenos se administraron por ruta intranasal, excepto en los casos que se indica. El resultado fue expresado como valores logarítmicos de los títulos y las barras representan el valor de la media geométrica y los intervalos de confianza.

**Figura 3.** Respuesta inmune sistémica, expresada a través de los títulos de anticuerpos IgG contra PME, de grupos de ratones inmunizados con PME o junto al polisacárido C como inmunopotenciador. A. PME, B. PME + Acemanano, C. PME + 2.5 µg de Polisacárido C, D. PME + 5 µg de Polisacárido C, E. Polisacárido C. El resultado fue expresado como valores logarítmicos de los títulos y las barras representan el valor de la media geométrica y los intervalos de confianza.

**Figura 4.** Respuesta de anticuerpos IgA contra PME, a nivel mucosal, en ratones inmunizados con dichas proteínas o coadministradas con polisacárido C. A. PME, B. PME + Acemanano, C. PME + 2.5 µg de Polisacárido C, D. PME + 5 µg de Polisacárido C, E. Polisacárido C. El resultado fue expresado como valores logarítmicos de los títulos y las barras representan el valor de la media geométrica y los intervalos de confianza.

**Figura 5.** Protección pasiva contra la infección meningocócica, determinada en el modelo de ratas infantes. Los antisueros se administraron por ruta intraperitoneal y una hora después los animales se retaron con *Neisseria meningitidis* (cepa CU385). En el gráfico se muestran los niveles de bacteremia determinados en las ratas 4 h después del reto. Las ratas recibieron los antisueros obtenidos al inmunizar ratones con: A. PME, C. PME + 2.5 µg de Polisacárido C, D. PME + 5 µg de Polisacárido C.

Como Control negativo (C-) se empleó suero de ratones no inmunizados y como Control positivo (C+) un suero hiperinmune de ratón inmunizado con PME por ruta intraperitoneal previamente. En el análisis estadístico,  $p<0.05$  se consideró diferencia significativa.

- 5 **Figura 6.** Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG contra PME. Los ratones de los grupos referidos en el gráfico fueron inmunizados con: A. PME, B. PME + Polisacárido A, C. PME + Polisacárido C, D. PME + Polisacárido A + Polisacárido C, E. Polisacárido A. F. Polisacárido C. Las barras representan el logaritmo de la media geométrica de los títulos y los intervalos de confianza.
- 10 **Figura 7.** Niveles de anticuerpos IgG contra HBsAg obtenidos al inmunizar ratones con: A. HBsAg + Polisacárido A, B. HBsAg + Polisacárido C, C. HBsAg. Las barras representan el logaritmo de la media geométrica de los títulos y los intervalos de confianza.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

**Ejemplo 1.****Efecto inmunopotenciador del polisacárido C de *N. meningitidis* y otros 5 polisacáridos en la respuesta contra HBsAg por vía intranasal.**

El objetivo del siguiente esquema de inmunización fue la evaluación del efecto de diferentes polisacáridos sobre la inmunogenicidad del HBsAg por vía nasal. Teniendo en cuenta el efecto adyuvante previamente reportado que presenta el acemanano, nos propusimos comparar el efecto de este, con el de otros 10 polisacáridos sobre el HBsAg con el fin de obtener nuevas fuentes de adyuvantes para potenciar nuevos antígenos por vía mucosal.

Se analizaron 8 grupos, de 8 ratones Balb/c cada uno, a los que se les suministraron, por vía intranasal o por vía subcutánea, dos dosis de 5 µg de HBsAg, los días 0 y 14. Las extracciones se realizaron los días 0 (suero preinmune) y 26. En 15 la Tabla 1 se muestra la composición de los grupos ensayados.

En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37°C y luego 30 min a 4°C. Despues se centrifugó durante 10 min a 3000 xg y se extrajo el suero, que se almacenó a -20°C. Los niveles de IgG específicos contra el HBsAg en el suero se determinaron por ELISA. El análisis estadístico de los 20 resultados se realizó por Análisis de Varianza. En ambos casos una  $p<0.05$  se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

En la Figura 1 se muestra que dos semanas después de la segunda inoculación, todos los polisacáridos presentaron actividad adyuvante, no presentando diferencias significativas respecto al grupo control inoculado por vía subcútanea con alúmina.

25

**Tabla 1.** Grupos inmunizados con diferentes polisacáridos, evaluados como adyuvantes nasales.

Grupo	Conc. HBsAg	Adyuvante	Conc. del adyuvante	Vía
A	5µg	Alúmina	0.25 mg/ml	SC
B	5µg	Acemanano	0.25 mg/ml	IN
C	5µg	Acemanano	0.35 mg/ml	IN
D	5µg	Polisacárido C	0.25 mg/ml	IN
E	5µg	Quitosan	0.25 mg/ml	IN
F	5µg	Dextrana <sup>a</sup>	0.35mg/ml	IN
G	5µg	Levano	0.35mg/ml	IN
H	5µg	PBS	--	IN

30

a: Dextrana, talla 500 000 Da.

Este efecto adyuvante se demostró debido a las diferencias significativas que mostraron los títulos de los grupos donde le fue administrado el HBsAg adyuvado 35 con los diferentes polisacáridos, cuando éstos fueron comparados con el grupo al que sólo se le administró el antígeno en PBS. El único grupo que no presentó diferencias significativas respecto al PBS como diluente fue el grupo al que se le inoculó Levano como adyuvante, por lo que pudiera concluirse que este polisacárido no tiene efecto inmunopotenciador, aunque este no difiere significativamente de los

demás polisacáridos. El polisacárido del serogrupo C, como se muestra en el gráfico, resultó ser el adyuvante que generó mayor título de anticuerpos contra el HBsAg, el que fue significativamente diferente de los demás grupos.

Entre los polisacáridos estudiados, el polisacárido C de *N. meningitidis* puede ser 5 usado como otra fuente de adyuvante, ya que se demostró su efecto inmunopotenciador sobre el HBsAg por vía nasal, similar en intensidad al grupo control inmunizado con hidróxido de aluminio.

**Ejemplo 2.**

10 **Efecto inmunopotenciador del polisacárido C de *N. meningitidis* en la respuesta contra OMP del serogrupo B de la misma bacteria, por vía intranasal.** Se utilizó el siguiente esquema de inmunización para evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido C de *N. meningitidis*, en la respuesta contra OMP provenientes de una cepa del serogrupo B del propio microorganismo, por vía 15 intranasal.

15 El esquema incluyó 48 ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas y fueron distribuidos en 6 grupos (con 8 animales cada uno) que abarcaron las combinaciones requeridas para este estudio, así como variantes controles con los antígenos por separado. Las inmunizaciones se realizaron por vía intranasal o 20 subcutánea a los 0, 15 y 30 días. Las extracciones de sangre se realizaron los días 0, 14, 29 y 45. En la Tabla 2 se describen los grupos estudiados.

**Tabla 2.** Esquema de inmunización realizado para evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido C en la respuesta inmune contra OMP.

25

Grupo	Conc. de OMP	Conc. de PsC	Vía
A	50 $\mu$ g	--	IN
B	10 $\mu$ g	--	SC
C	50 $\mu$ g	5 $\mu$ g	IN
D	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g	IN
E	--	50 $\mu$ g	IN
F	--	50 $\mu$ g	SC

25 En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37 °C y luego 30 min a 4°C. Después se centrifugó durante 10 min a 3000 x g 30 y se extrajo el suero, que se almacenó a -20°C. Los títulos de anticuerpos contra OMP se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los títulos de 35 anticuerpos, se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas, según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos, en las combinaciones necesarias, se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

35 En la Figura 2 se representan los logaritmos de la media geométrica de los títulos (Log MGT) correspondientes a cada grupo, con sus límites inferior y superior.

40 Después de la tercera inoculación se observó la potenciación de la respuesta contra la OMP por parte del polisacárido C. Los títulos determinados por ELISA difieren significativamente entre el grupo que contiene solamente OMP y los grupos que contienen además el polisacárido C como adyuvante. Además, el efecto

inmunopotenciador se observó a través del aumento considerable del título de anticuerpos bactericidas de los grupos donde se combinan el polisacárido con OMP, respecto al grupo inmunizado con OMP solamente, lo que se muestra en la Tabla 3. El título de anticuerpos bactericidas fue expresado como el recíproco de la mayor dilución de anticuerpos evaluada, capaz de matar el 50% ó más de las bacterias.

**Tabla 3.** Títulos de anticuerpos contra OMP y títulos bactericidas correspondientes a los grupos A-D.

Grupo	MGT (IgG)	Título bact.
A	14084	2048
B	5787	1024
C	47910	8192
D	50187	8192

10

**Ejemplo 3.**

**Influencia de la concentración de polisacárido C de *N. meningitidis* en su efecto inmunopotenciador de la respuesta contra OMP, por vía intranasal.**

15 Despues de demostrar la capacidad inmunopotenciadora del polisacárido C, se procedió a disminuir la dosis del mismo empleada como adyuvante de OMP. Con este objetivo se diseñó un esquema de 50 ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron divididos en 5 grupos de 10 animales cada uno (Tabla 4). Los días 0, 15 y 30 se realizaron las inmunizaciones por vía intranasal, 20 mientras que las extracciones de sangre se efectuaron a los 0, 14, 29 y 45 días.

**Tabla 4.** Esquema de inmunización donde se compara el efecto inmunopotenciador del polisacárido C, en dos concentraciones, sobre la respuesta contra OMP.

Grupo	Conc. de OMP	Conc. de PsC	Conc. de acemanano
A	50 µg	--	--
B	50 µg	--	0.35mg/mL
C	50 µg	2.5 µg	--
D	50 µg	5 µg	--
E	--	5 µg	--

25

En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37 °C y luego 30 min a 4°C. Despues se centrifugó durante 10 min a 3000 x g y se extrajo el suero, que se almacenó a -20°C. Los títulos de anticuerpos contra OMP se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó 30 el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas, según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos, en las combinaciones necesarias, se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn. 35 La Figura 3 representa esquemáticamente los resultados de este esquema de inmunización. En este caso se ensayaron dos concentraciones de polisacárido. En ambos casos se obtuvo un incremento del título de anticuerpos (IgG) en suero contra

OMP y este efecto fue mayor que el del acemanano (de acuerdo a la comparación con una variante que posee este adyuvante). A las concentraciones de polisacárido C estudiadas (2.5 µg y 5 µg) no se detectan niveles de anticuerpos contra el mismo, por lo que se demuestra que predomina su efecto inmunopotenciador sobre su capacidad inmunogénica, incluso a una concentración inferior (2.5 µg) a la referida en el ejemplo anterior. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de anticuerpos anti-OMP generados con ambas concentraciones de polisacárido C, como inmunopotenciador, en la formulación. El título de anticuerpos bactericidas también se incrementó apreciablemente en los grupos donde se combina OMP con el polisacárido C, como se observa en la Tabla 5. Dicho título se expresa como el recíproco de la mayor dilución de anticuerpos evaluada, capaz de matar el 50% ó más de las bacterias.

**Tabla 5.** Títulos de anticuerpos contra OMP y títulos bactericidas correspondientes a los grupos A-D.

Grupo	MGT (IgG)	Título bact.
A	8780	128
B	7268	256
C	15383	1024
D	19170	1024

La respuesta de anticuerpos a nivel mucosal se comportó de forma similar, con un incremento en el título de IgA en ratones inmunizados con la combinación de OMP y polisacárido C (en ambas concentraciones) respecto a los que recibieron sólo OMP, lo cual se aprecia en la Figura 4.

**Ejemplo 4.**

**25 Experimento de protección contra la infección meningocóccica en el modelo de ratas infantes.**

Con el objetivo de desarrollar otro método para evaluar la actividad funcional de los anticuerpos, se realizó un experimento de protección pasiva en el modelo de infección en ratas infantes. Los controles utilizados fueron: un suero preinmune (control negativo) y un suero hiperinmune de un ratón inmunizado, por vía subcutánea, con OMP de la cepa B385 de *N. meningitidis*. Los sueros analizados en el modelo animal son los obtenidos en el Ejemplo 3. Teniendo en cuenta los resultados de la determinación de la actividad bactericida, sólo se estudiaron 3 variantes de ese esquema de inmunización y otros 2 grupos de ratas inoculadas con los sueros controles. Por tanto, se emplearon 30 ratas de 5 a 6 días de nacidas, divididas en 5 grupos de 6 animales cada uno.

El objetivo fue determinar si los sueros que se administran por la vía intraperitoneal protegen a las ratas de la infección por la bacteria inoculada por la misma vía una hora después. Los sueros de cada grupo de ratones inmunizados se mezclaron antes de ser inoculados en ratas infantes. Para la interpretación de los resultados se realizó un Análisis de Varianza (Anova) seguido de un análisis de comparación múltiple de Dunnet, donde se comparan los grupos en estudio con el control negativo. Como se observa en la Figura 5 el grupo que recibió el antisuero contra OMP no mostró diferencia significativa respecto al control negativo, mientras los grupos que recibieron OMP y polisacárido C (2.5 ó 5 µg) si difieren significativamente

de dicho control. Mediante este experimento se comprobó el aumento de la funcionalidad de los anticuerpos en las variantes donde se combinan OMP y polisacárido, respecto a la variante en la que se inmunizó sólo con OMP, por vía intranasal.

5

**Ejemplo 5.**

**Comparación del efecto inmunopotenciador de los polisacáridos A y C de *N. meningitidis* y sus combinaciones en la respuesta contra OMP por vía intranasal.**

10 Se diseñó un esquema de inmunización con el objetivo de evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido A de *N. meningitidis* y compararlo con el polisacárido C de esta misma bacteria.

En el esquema se utilizaron 60 ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas de edad, distribuidos en 6 grupos de 10 ratones cada uno, que recibieron el inmunógeno 15 reflejado en la Tabla 6:

**Tabla 6. Composición de los inmunógenos estudiados en el Ejemplo 5.**

Grupo	Conc del PsA	Conc de PsC	Conc de OMP
A	—	—	50 µg
B	5 µg	—	50 µg
C	—	5 µg	50 µg
D	5 µg	5 µg	50 µg
E	5 µg	—	—
F	—	5 µg	—

20

Los días 0, 15 y 30 se realizaron las inmunizaciones por vía intranasal, mientras que las extracciones de sangre se efectuaron a los 0, 14, 29 y 45 días. En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37 °C 25 y luego 30 min a 4°C. Despues se centrifugó durante 10 min a 3000 x g y se extrajo el suero, que se almacenó a -20 °C. Los títulos de anticuerpos contra OMP se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas 30 según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Como se muestra en la Figura 6 se evaluó la respuesta de anticuerpos generada contra OMP luego de la administración nasal de dichas formulaciones, y resultó que 35 los grupos inmunizados con las formulaciones compuestas por polisacárido A y/o C y OMP tuvieron un mayor título de anticuerpos contra las proteínas de membrana externa, que el grupo control inmunizado sólo con OMP. En el caso donde se combinan los dos polisacáridos y OMP, el título de anticuerpos contra OMP fue superior al alcanzado con las variantes que recibieron los polisacáridos por 40 separado, aunque no resultó apreciable la diferencia en cuanto a la actividad bactericida entre los grupos referidos anteriormente, tal como se observa en la

Tabla 7. El título de anticuerpos bactericida fue expresado como el recíproco de la mayor dilución de anticuerpos evaluada, capaz de matar el 50% ó más de las bacterias.

5 **Tabla 7.** Títulos de anticuerpos contra OMP y títulos bactericidas correspondientes a los grupos A-D.

Grupo	MGT (IgG)	Título bact
A	6839	1024
B	16788	4096
C	22698	4096
D	61094	8192

**Ejemplo 6**

10 **Efecto inmunopotenciador del polisacárido A de *N. meningitidis* en la respuesta contra HBsAg, por vía intranasal.**

A través del esquema que se describe a continuación se evaluó el efecto adyuvante del polisacárido A de *N. meningitidis* sobre la inmunogenicidad del HBsAg por vía nasal. El esquema incluyó 30 ratones distribuidos en 3 grupos de 10 ratones cada uno, que recibieron el inmunógeno de acuerdo a la Tabla 8.

15 **Tabla 8.** Composición de los inmunógenos estudiados en el Ejemplo 6.

Grupo	Conc de HBsAg	Conc. de PsA	Conc de PsC
A	5 µg	5 µg	—
B	5 µg	—	5 µg
C	5 µg	--	--

20 En este experimento se compara el efecto inmunopotenciador del polisacárido A, con el del polisacárido C empleando un nuevo antígeno modelo.

Los días 0, 15 y 30 se realizaron las inmunizaciones por vía intranasal, mientras que las extracciones de sangre se efectuaron a los 0, 29 y 45 días. En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37°C y luego 30 min a 4°C. Después se centrifugó durante 10 min a 3000 x g y se extrajo el suero, que se almacenó a -20°C. Los títulos de anticuerpos contra HBsAg se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Después de administrar tres dosis de las formulaciones mencionadas, el polisacárido A presentó efecto adyuvante sobre el HBsAg, ya que ocurrió un significativo aumento de los niveles de IgG específicos al HBsAg, en aquellos grupos que recibieron la combinación de los dos antígenos respecto al que sólo recibió el antígeno recombinante en PBS, lo cual se observa en la Figura 7. Este efecto adyuvante fue similar al del polisacárido C, mostrado en este mismo ejemplo.

**Ejemplo 7.****Efecto inmunopotenciador del polisacárido C en la respuesta contra antígenos proteicos solubles, sus conjugados y bacterinas, por vía intranasal.**

5 Con el objetivo de evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido C sobre la inmunogenicidad de otros antígenos con los cuales se combina, se diseñaron dos esquemas de inmunización. En el primero se incluyen diferentes variantes del polisacárido y los antígenos proteicos solubles: toxoide tetánico (TT) y toxoide diftérico (TD), los conjugados de TT a un polisacárido de *Haemophilus influenzae* y 10 polisacárido A, además combinaciones del polisacárido C con un conjugado de P64k a un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*.

En el esquema se utilizaron 112 ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas de edad, distribuidos en grupos de 8 cada uno, y recibieron el inmunógeno reflejado en la Tabla 9:

15

**Tabla 9. Composición de los inmunógenos evaluados en el Ejemplo 7.**

20

Grupo	Conc(PsC)	Conc(TT)	Conc(TD)	Conc (TT-Hib)	Conc (TT-PsA)	Conc(P64k-pneumoc.)
1	5 µg	10 µg	--	--	--	--
2	5 µg	--	10 µg	--	--	--
3	--	10 µg	--	--	--	--
4	--	--	10 µg	--	--	--
5	5 µg	--	--	10 µg	--	--
6	5 µg	--	--	--	10 µg	--
7	5 µg	--	--	--	--	10 µg
8	--	--	--	10 µg	--	--
9	--	--	--	--	10 µg	--
10	--	--	--	--	--	10 µg
11	5 µg	10 µg	--	--	--	10 µg
12	5 µg	--	10 µg	--	--	10 µg
13	5 µg	--	10 µg	10 µg	--	--
14	5 µg	--	10 µg	--	10 µg	--

Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 15 y 30, por vía intranasal, mientras que las extracciones de sangre se efectuaron a los 0, 14, 29 y 45 días. En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37°C 25 y luego 30 min a 4°C. Después, se centrifugó durante 10 min a 3000 x g y se extrajo el suero, que se almacenó a -20 °C. Los títulos de anticuerpos contra los antígenos utilizados o sus conjugados se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre 30 los grupos no eran homogéneas según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Después de la tercera inoculación por vía nasal, se detectó un incremento del título de anticuerpos IgG contra los antígenos administrados junto al polisacárido C, respecto al grupo control inmunizado con los antígenos por separado. El incremento observado fue significativo y de esta forma se demostró estadísticamente que el polisacárido C contra antígenos solubles o

5 efecto adyuvante de una amplia gama de sus conjugados. Los siguientes grupos 10 inmunógenos polisacárido y otro 10 se refleja la media 15 títulos de anticuerpos correspondiente.

Grupo	M Geom.. Título IgG
1	4569
2	3782
3	167
4	210
5	6734
6	5684
7	5271
8	250
9	315
10	145

recibieron formados por el antígeno. En la Tabla geométrica de los títulos de anticuerpos contra el antígeno

20

25

**Tabla 10.** Media geométrica de los títulos de anticuerpos determinados por ELISA.

30 El resto de los grupos recibieron inmunógenos compuestos por varios antígenos y en todos los casos se evaluó la respuesta de anticuerpos contra cada componente de la combinación. De esta forma se evidenció, una vez más, la capacidad inmunopotenciadora del polisacárido C. Los anticuerpos que reconocen un determinado antígeno no interfieren, ni impiden el reconocimiento de otro antígeno presente en la misma mezcla.

35

**Ejemplo 8.**

**Efecto inmunopotenciador del polisacárido C coadministrado con el HBsAg por vía nasal en forma de gotas, aerosoles o polvo.**

40 Después de demostrar en el Ejemplo 1, la acción inmunopotenciadora del polisacárido C sobre la respuesta de anticuerpos contra HBsAg, se diseñó un esquema donde se suministró por vía nasal en forma de gotas, aerosoles o polvo, una combinación de los antígenos referidos.

45 Se utilizaron 18 conejos Nueva Zelanda, de 2 a 3 kg de peso, distribuidos en 6 grupos, de 3 conejos cada uno. Los grupos inmunizados se describen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Composición de los inmunógenos administrados en el Ejemplo 8.

Grupo	Conc(PsC)	Cant(HBsAg)	Forma de administración
-------	-----------	-------------	-------------------------

A	0.25 mg/mL	20 µg	gotas
B	0.25 mg/mL	20 µg	aerosol
C	0.25 mg/mL	20 µg	polvo
D	--	20 µg	gotas
E	--	20 µg	aerosol
F	--	20 µg	polvo

Los días 0, 15 y 30 se realizaron las inmunizaciones por vía intranasal, mientras que las extracciones de sangre se efectuaron a los 0, 29 y 45 días. Se evaluó la respuesta de anticuerpos contra el HBsAg por ELISA y se detectó que no hubo diferencia significativa en los títulos de IgG, cuando se utilizaron las diferentes formas de administración para inocular este antígeno recombinante y el polisacárido C (Tabla 12), pero cuando el polisacárido no estaba presente los niveles de anticuerpos fueron significativamente inferiores.

10

15

Tabla 12. Títulos de anticuerpos medidos por ELISA.

Grupo	M Geom. Título IgG
A	17850
B	20300
C	23200
D	1700
E	3400
F	1920

20

**Ejemplo 9.**

**Efecto inmunopotenciador del polisacárido C de *N. meningitidis* en la respuesta contra OMP del serogrupo B de la misma bacteria, por diferentes rutas de inmunización mucosal.**

25 Se utilizó el siguiente esquema de inmunización para evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido C de *N. meningitidis*, en la respuesta contra OMP provenientes de una cepa del serogrupo B del propio microorganismo, por diversas rutas de administración mucosal.

El esquema incluyó 56 ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas y fueron 30 distribuidos en 7 grupos (con 8 animales cada uno) que abarcaron las combinaciones requeridas para este estudio. Las inmunizaciones que incluyeron las OMP, combinadas o no con el polisacárido C de *N. meningitidis*, se realizaron por vía subcutánea, intranasal, sublingual (SL) u oral (O) a los 0, 15 y 30 días. Para las inmunizaciones por rutas mucosales, los animales se anestesiaron por ruta 35 intraperitoneal con 30 µl de ketamina (10 mg/ml). Las extracciones de sangre se realizaron los días 0, 14, 29 y 45. En la Tabla 13 se describen los grupos estudiados.

**Tabla 13.** Esquema de inmunización realizado para evaluar el efecto inmunopotenciador del polisacárido C administrado por diversas rutas.

Grupo	Conc. de OMP	Conc. de PsC	Vía
A	10 µg	—	SC
B	50 µg	5 µg	IN
C	50 µg	5 µg	O
D	50 µg	5 µg	SL
E	50 µg	--	IN
F	50 µg	--	O
G	50 µg	--	SL

5

En los días mencionados se extrajo la sangre por punción retro-orbital, se incubó 30 min a 37 °C y luego 30 min a 4°C. Después se centrifugó durante 10 min a 3000 x g y se extrajo el suero, que se almacenó a -20°C. Los títulos de anticuerpos contra OMP se evaluaron por ELISA. Para el análisis estadístico de los títulos de anticuerpos, se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple. En la comparación de las medias de los tratamientos, en las combinaciones necesarias, se empleó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Como se observa en la Tabla 14, después de la tercera inyección se observó la 10 potenciación de la respuesta contra las OMP por parte del polisacárido C, por todas las rutas mucosales estudiadas. Los títulos determinados por ELISA difieren 15 significativamente entre el grupo que contiene solamente OMP y los grupos que contienen además el polisacárido C como adyuvante. Además, el efecto inmunopotenciador se observó a través del aumento considerable del título de 20 anticuerpos bactericidas de los grupos donde se combinan el polisacárido con OMP, respecto al grupo inmunizado con OMP solamente.

**Tabla 14.** Títulos de anticuerpos contra OMP.

Grupo	MGT (IgG)
A	45 674
B	39 680
C	29 457
D	31 625
E	8652
F	5426
G	4839

25

30

## REIVINDICACIONES

POLISACÁRIDOS CAPSULARES DE *Neisseria meningitidis* COMO INMUNOPOTENCIADORES MUCOSALES Y FORMULACIONES RESULTANTES

5 1. Inmunopotenciador mucosal para formulaciones farmacéuticas caracterizado por ser polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* y ser capaz de inmunopotenciar la respuesta inmune para el antígeno o los antígenos presentes en dichas formulaciones.

10 2. Inmunopotenciador mucosal para formulaciones farmacéuticas caracterizado por ser el polisacárido capsular A, el polisacárido capsular C, o ambos, pertenecientes a *N. meningitidis* y ser capaz de inmunopotenciar la respuesta inmune mucosal para el antígeno o los antígenos presentes en dichas formulaciones.

15 3. Inmunopotenciador mucosal para formulaciones farmacéuticas caracterizado por ser polisacáridos capsulares de *Neisseria meningitidis* y ser capaz de inducir una respuesta inmune funcional contra el patógeno del que se deriva el antígeno o los antígenos presentes en dichas formulaciones.

20 4. Inmunopotenciador mucosal para formulaciones farmacéuticas caracterizado por ser el polisacárido capsular A, el polisacárido capsular C, o ambos, pertenecientes a *N. meningitidis* y ser capaz de inducir una respuesta inmune funcional contra el patógeno del cual se deriva el antígeno o los antígenos presentes en dichas formulaciones.

25 5. Inmunopotenciador mucosal para formulaciones farmacéuticas, de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, y 5, caracterizado porque la concentración optima de polisacárido en la formulación es de 0.01 microgramos a 50 microgramos.

30 6. Formulación farmacéutica caracterizada porque contiene el inmunopotenciador de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, y 5, y el mismo se encuentra a una concentración de 0.01 microgramos a 50 microgramos, de acuerdo con la reivindicación 5.

35 7. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el componente antigénico es de naturaleza proteica, sacarídica o combinaciones, mezclas o conjugados de estos.

40 8. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es el toxoide tetánico, o un conjugado del mismo.

45 9. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es el toxoide diftérico, o un conjugado del mismo.

10. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es un conjugado proteína-polisacárido, anti-*Haemophilus influenzae* tipo b.
- 5 11. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es un conjugado proteína-polisacárido donde la porción polisacáridica se corresponde con los polisacáridos A y C de *Neisseria meningitidis*.
- 10 12. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es un conjugado proteína-polisacárido donde la porción polisacáridica se corresponde con un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*.
- 15 13. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es una o varias bacterinas.
14. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque el componente antigénico es la bacterina de *Bordetella pertussis*.
- 20 15. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el componente antigénico es un virus inactivado, partícula semejante a virus, o una combinación de ambos.
- 25 16. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 caracterizada por ser una formulación vacunal de uso mucosal.
- 30 17. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16, caracterizada por ser una formulación nasal, oral, vaginal o rectal, preventiva o terapéutica.

**FIGURAS**

Figura 1.

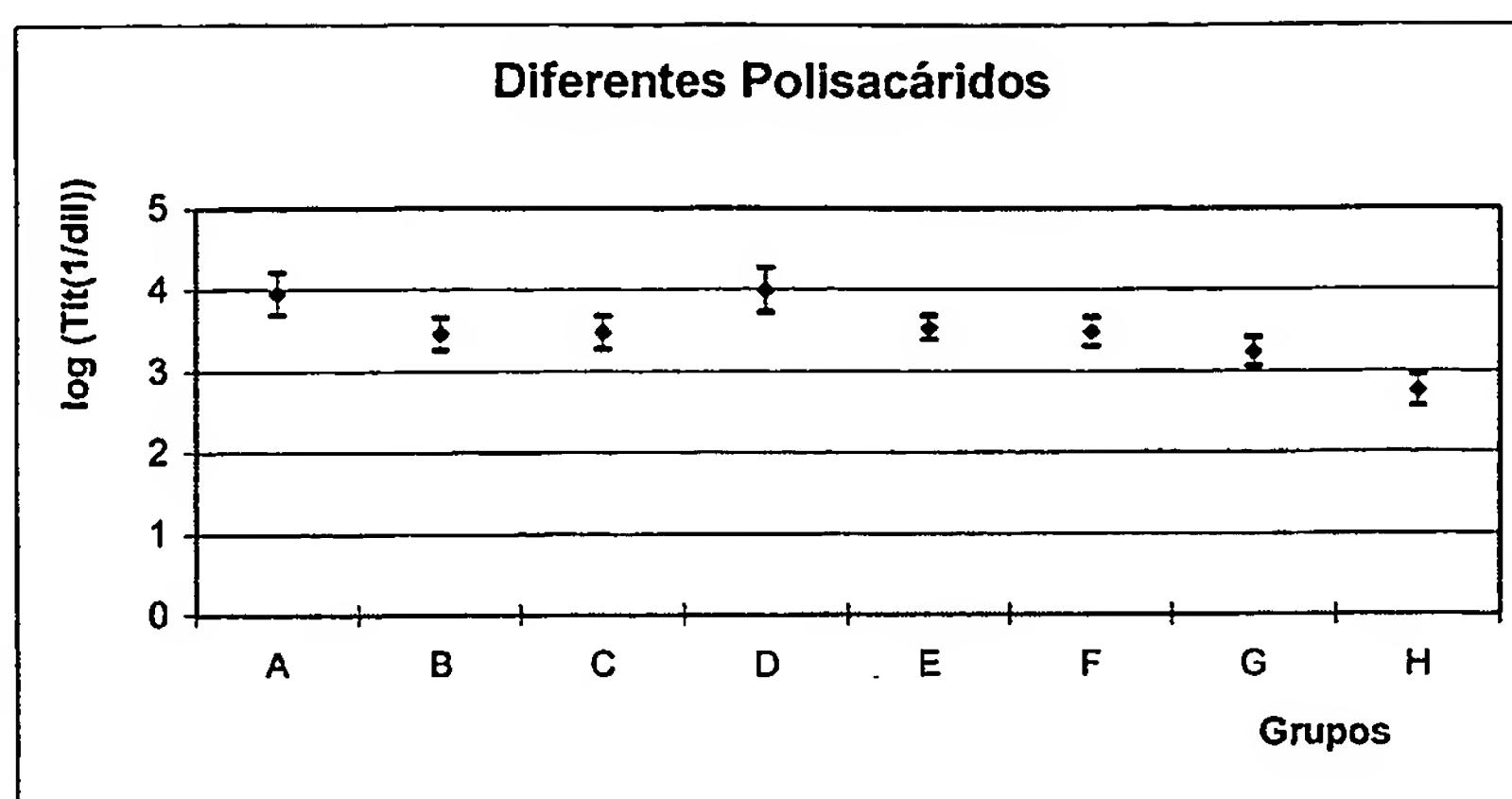


Figura 2.

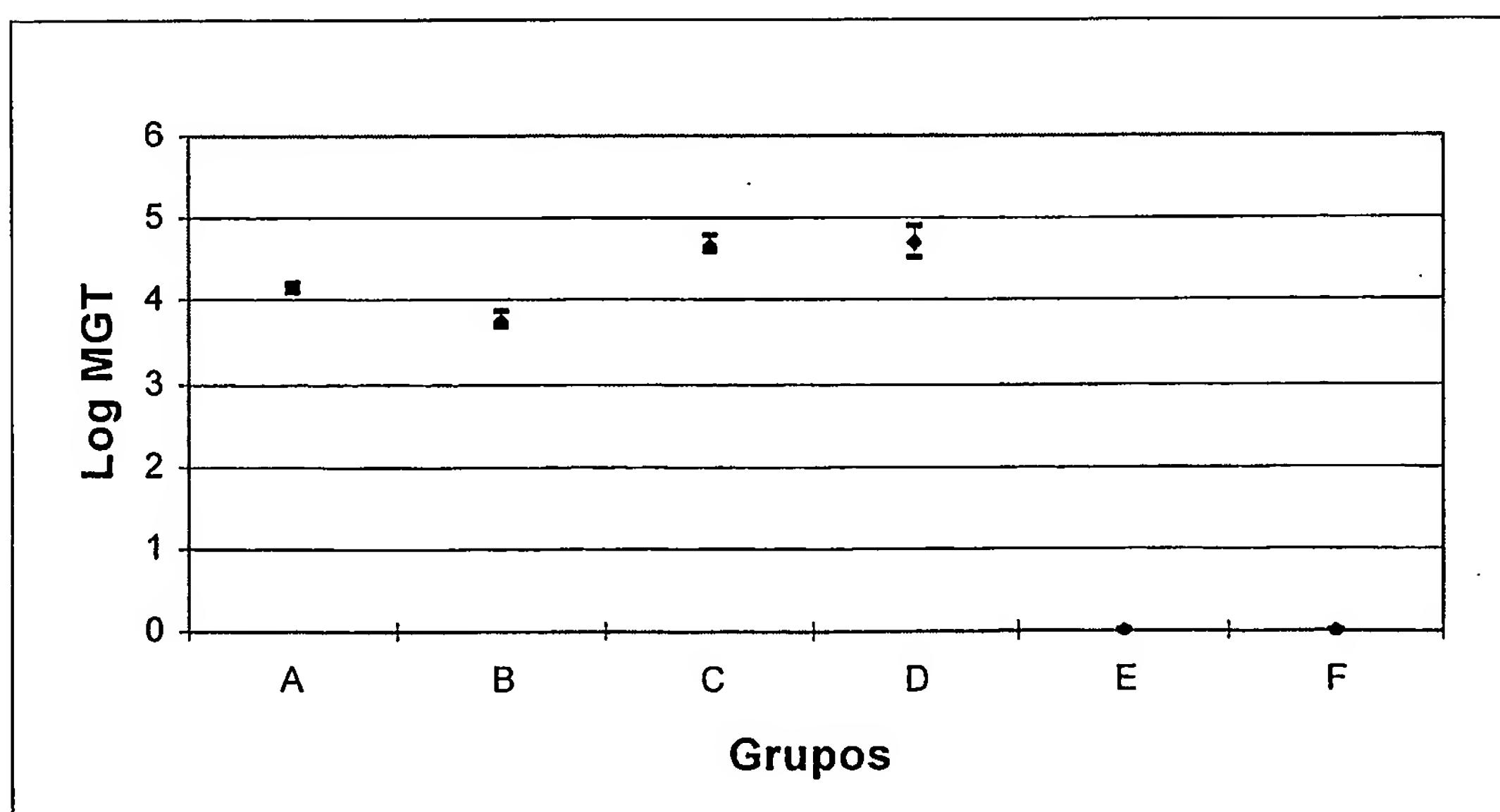


Figura 3.

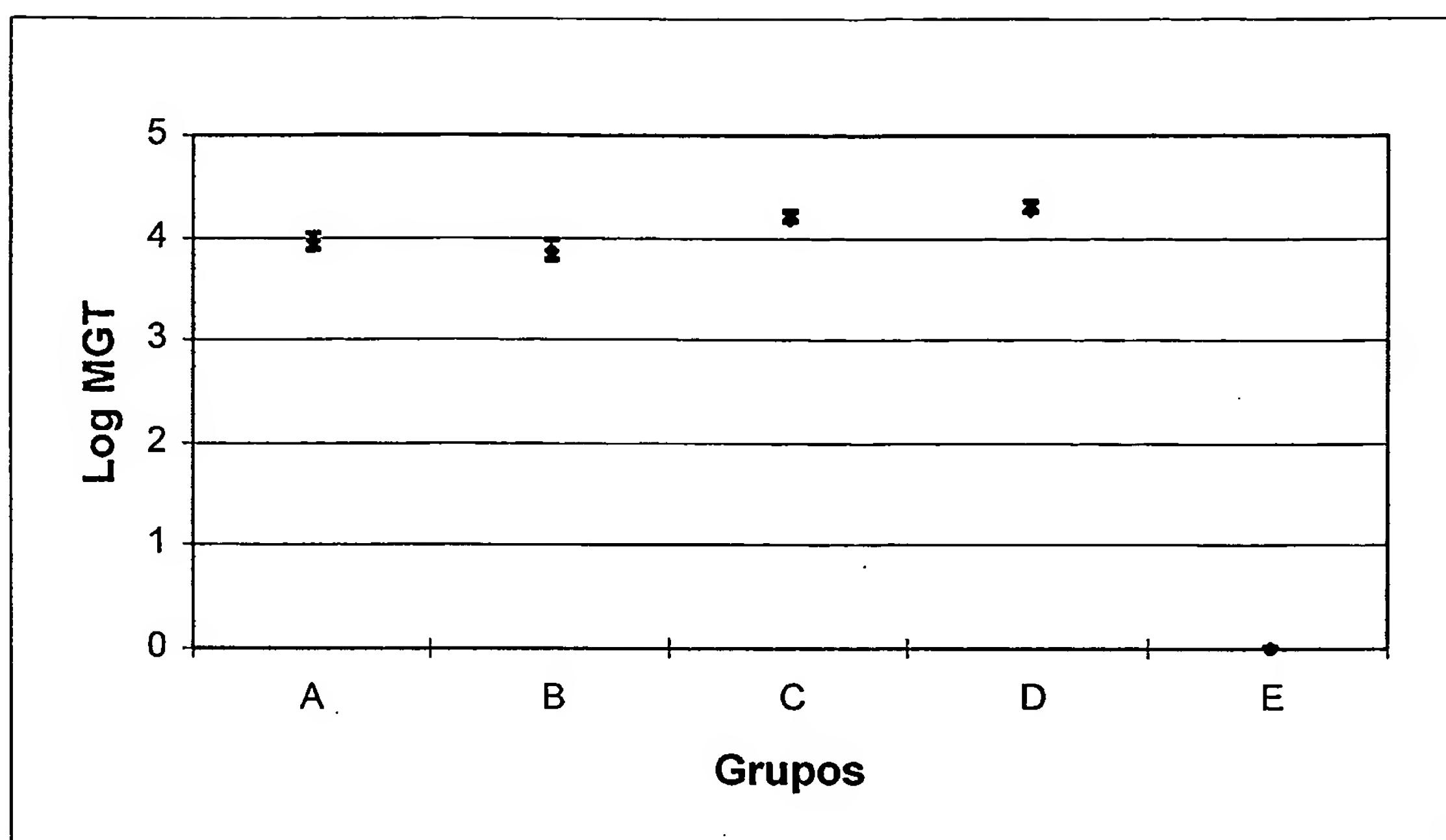


Figura 4.

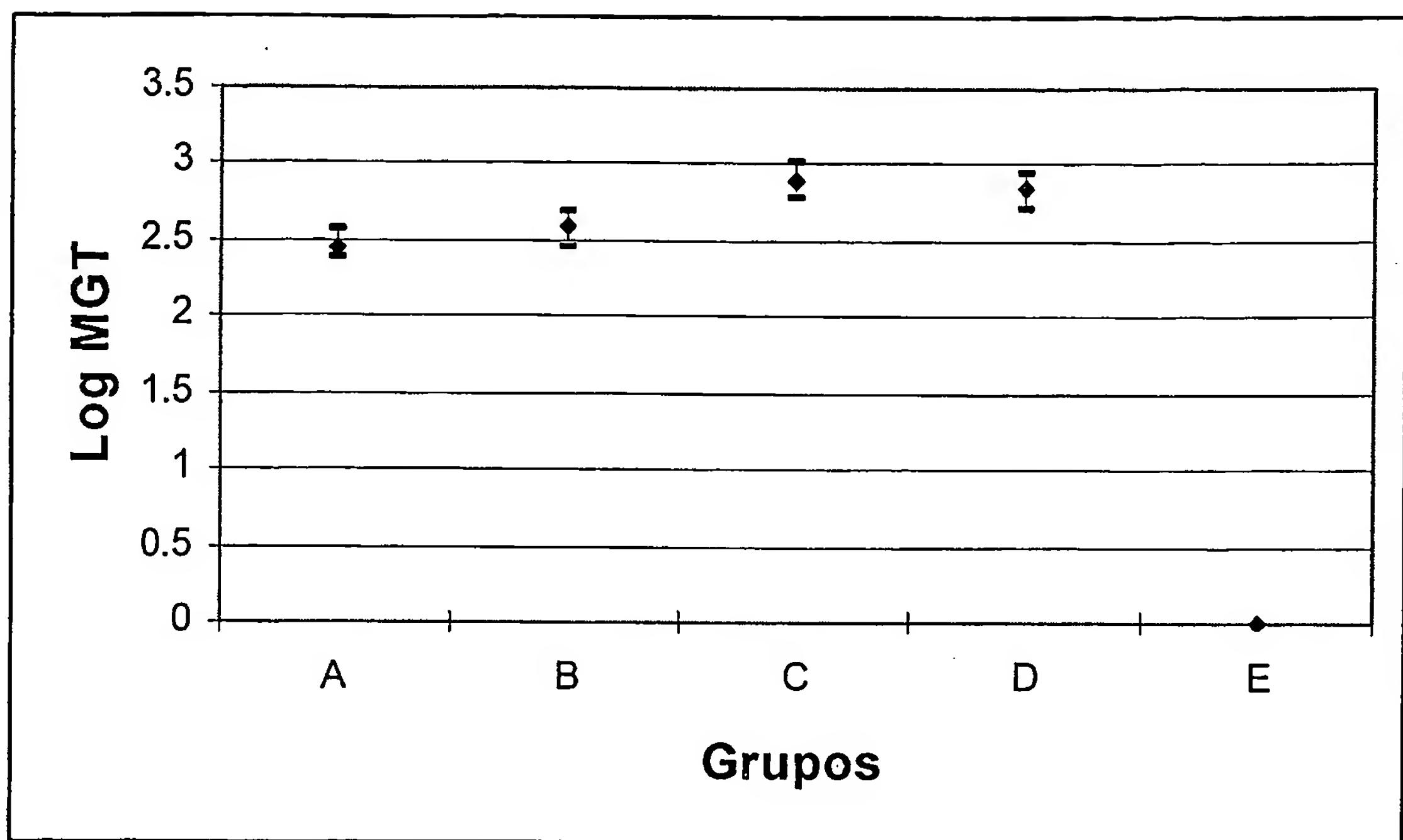


Figura 5.

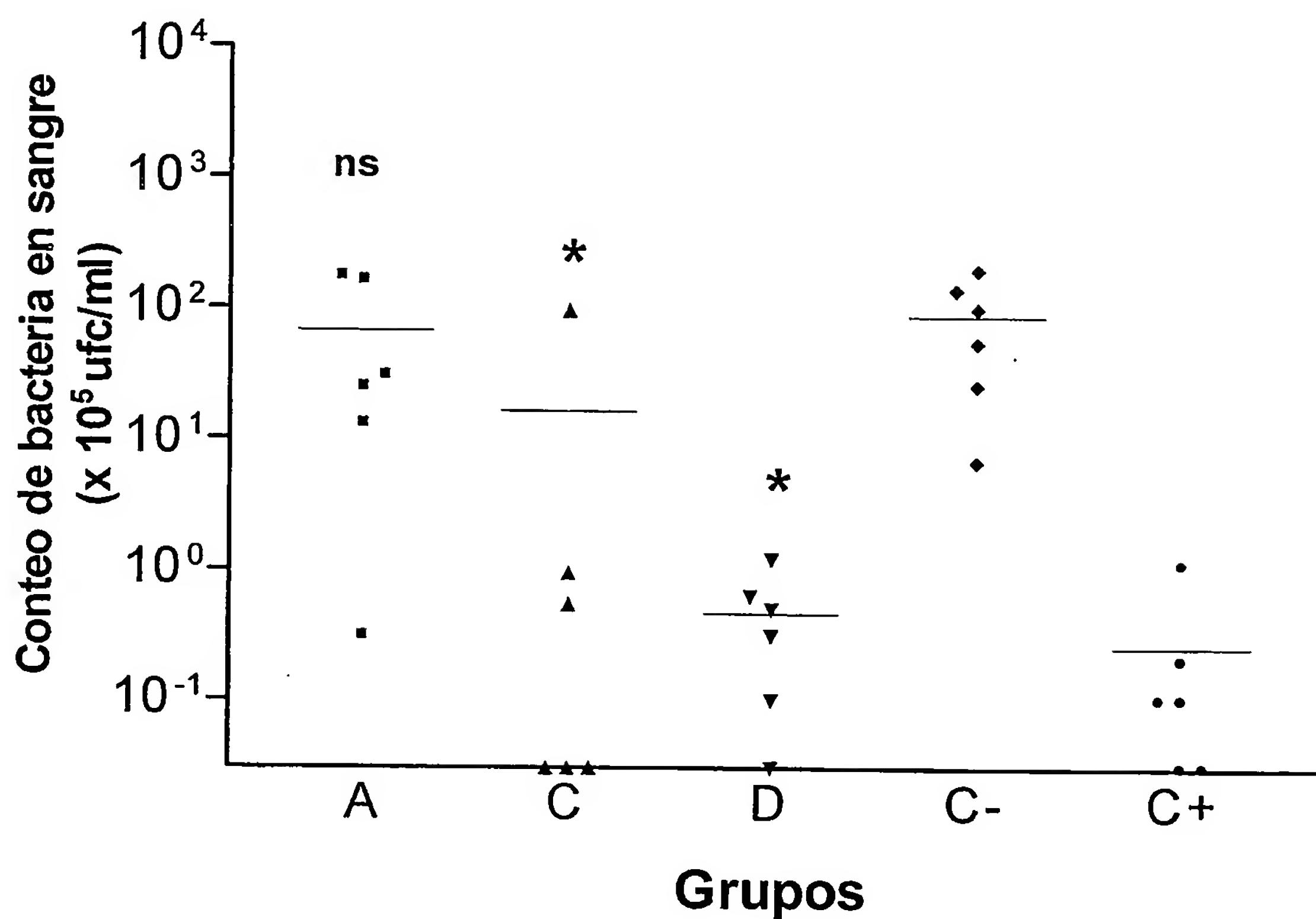


Figura 6.

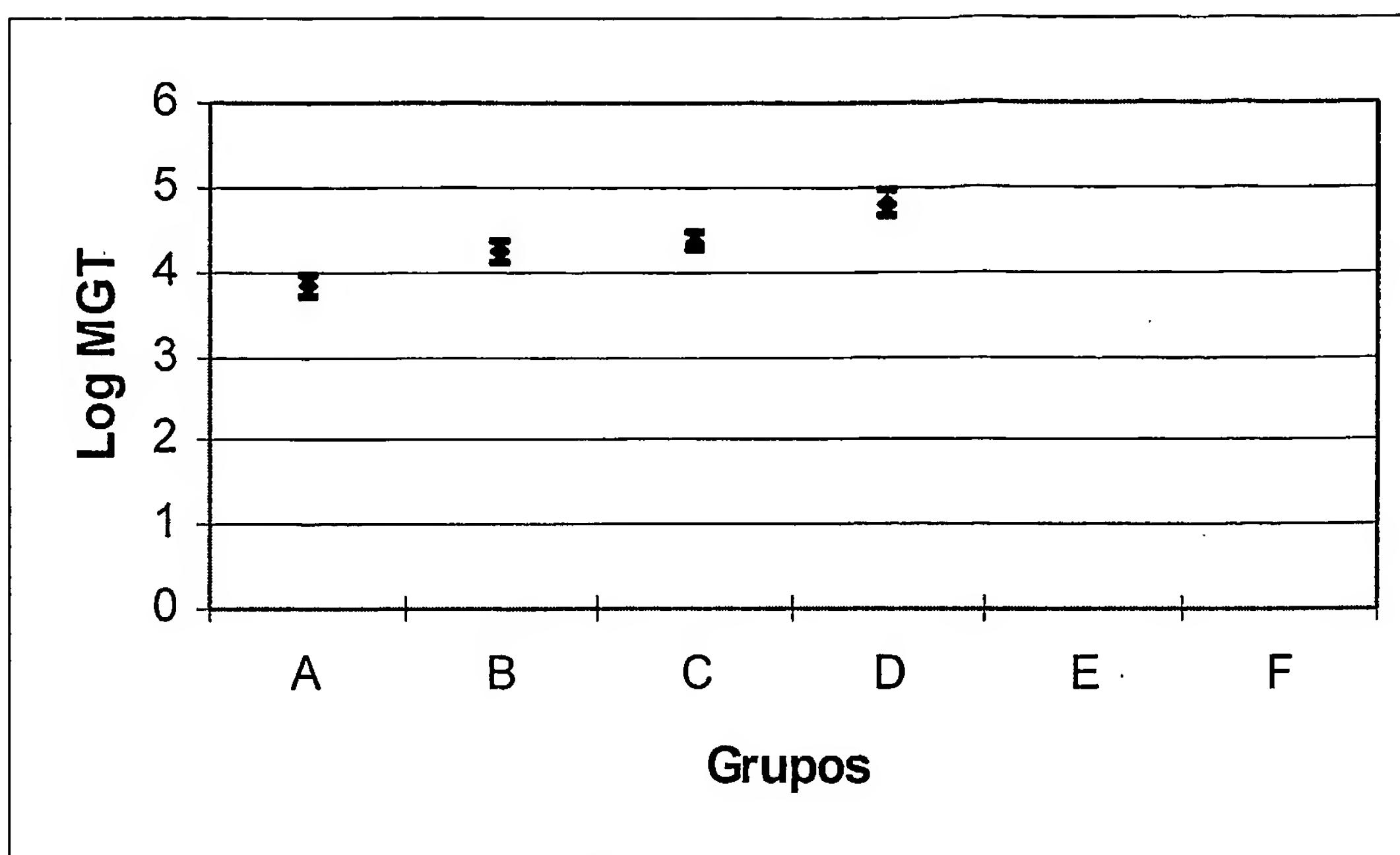
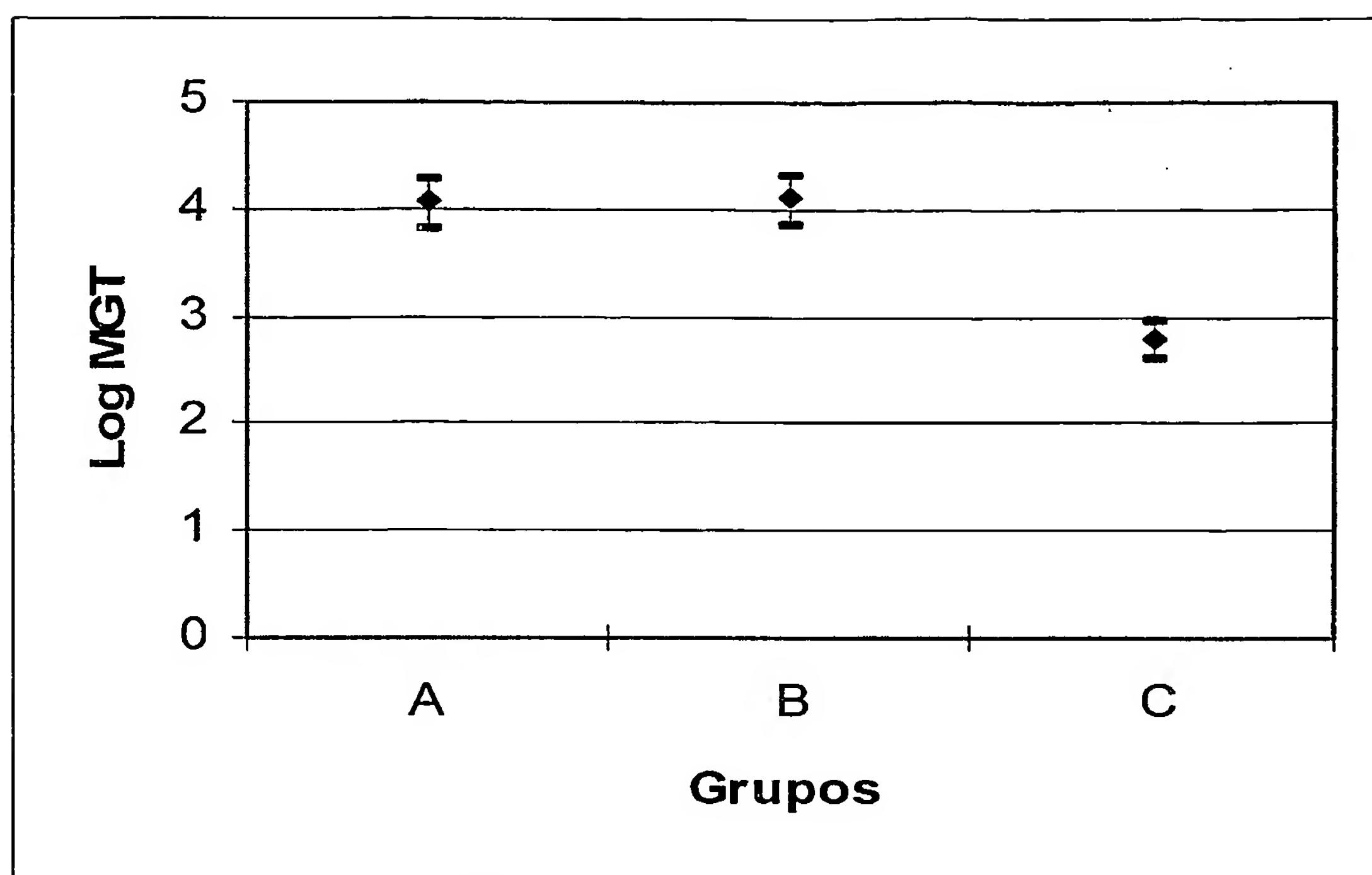


Figura 7.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU2004/000014

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**IPC 7 A61K39/095 A61P31/04**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC 7 A61K**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/00249 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; BOUTRIAU, DOMINIQUE; CAPIAU, CARIN) 3 January 2002 (2002-01-03) page 1, line 22 - page 2, line 3 claims; examples ----- X SAUNDERS NANCY B ET AL: "Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 67, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 113-119, XP002314671 ISSN: 0019-9567 the whole document -----	1-17
		1-17 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the International search report

15 March 2005

29/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rankin, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU2004/000014

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JIN ZHIGANG ET AL: "Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice"</p> <p>INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 71, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 5115-5120, XP002314672</p> <p>ISSN: 0019-9567</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
X	<p>SELANDER B ET AL: "VACCINATION RESPONSES TO CAPSULAR POLYSACCHARIDES OF NEISSERIA MENINGITIDIS AND HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B IN TWO C2-DEFICIENT SISTERS: ALTERNATIVE PATHWAY-MEDIATED BACTERIAL KILLING AND EVIDENCE FOR A NOVEL TYPE OF BLOCKING IGG"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, PLENUM PUBLISHING CO, US, vol. 20, no. 2, March 2000 (2000-03), pages 138-149, XP000946794</p> <p>ISSN: 0271-9142</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU2004/000014

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0200249	A	03-01-2002	AU 8189501 A	08-01-2002
			BG 107422 A	30-09-2003
			BR 0112057 A	17-06-2003
			CA 2412497 A1	03-01-2002
			CN 1449293 A	15-10-2003
			CZ 20024224 A3	14-05-2003
			WO 0200249 A2	03-01-2002
			EP 1296715 A2	02-04-2003
			HU 0301413 A2	28-08-2003
			JP 2004501873 T	22-01-2004
			MA 25824 A1	01-07-2003
			NO 20026175 A	26-02-2003
			PL 360265 A1	06-09-2004
			SK 18432002 A3	05-08-2003
			US 2003180316 A1	25-09-2003
			ZA 200300755 A	28-04-2004
			CA 2442865 A1	17-10-2002
			CZ 20032698 A3	15-12-2004
			WO 02080965 A2	17-10-2002
			EP 1390066 A2	25-02-2004
			HU 0303996 A2	01-03-2004
			MX PA03008961 A	12-02-2004
			NO 20034410 A	25-11-2003
			US 2004202668 A1	14-10-2004

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/CU2004/000014

## A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP 7 A61K39/095 A61P31/04

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 02/00249 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; BOUTRIAU, DOMINIQUE; CAPIAU, CARIN) el 3 de enero de 2002 (2002-01-03) página 1, línea 22 - página 2, línea 3 <u>reivindicaciones; ejemplos</u>	1-17
X	SAUNDERS NANCY B ET AL: "Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 67, no. 1, enero 1999 (1999-01), páginas 113-119, XP002314671 ISSN: 0019-9567 todo el documento	1-17

En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

Véase el Anexo de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

el 15 de marzo de 2005 (15.03.05)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

el 29 de marzo de 2005 (29.03.05)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

Funcionario autorizado

ISA/OEPM

Facsímil Nº

Teléfono Nº

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2004/000014

## C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
X	JIN ZHIGANG ET AL: "Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 71, no. 9, <b>septiembre</b> 2003 (2003-09), páginas 5115-5120, XP002314672 ISSN: 0019-9567 <b>todo el documento</b> -----	1-17
X	SELANDER B ET AL: "VACCINATION RESPONSES TO CAPSULAR POLYSACCHARIDES OF NEISSERIA MENINGITIDIS AND HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B IN TWO C2-DEFICIENT SISTERS: ALTERNATIVE PATHWAY-MEDIATED BACTERIAL KILLING AND EVIDENCE FOR A NOVEL TYPE OF BLOCKING IGG" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, PLENUM PUBLISHING CO, US, vol. 20, no. 2, <b>marzo</b> 2000 (2000-03), páginas 138-149, XP000946794 ISSN: 0271-9142 <b>todo el documento</b> -----	1-17

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/CU2004/000014

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0200249	A 03-01-2002	AU 8189501 A	08-01-2002	
		BG 107422 A	30-09-2003	
		BR 0112057 A	17-06-2003	
		CA 2412497 A1	03-01-2002	
		CN 1449293 A	15-10-2003	
		CZ 20024224 A3	14-05-2003	
		WO 0200249 A2	03-01-2002	
		EP 1296715 A2	02-04-2003	
		HU 0301413 A2	28-08-2003	
		JP 2004501873 T	22-01-2004	
		MA 25824 A1	01-07-2003	
		NO 20026175 A	26-02-2003	
		PL 360265 A1	06-09-2004	
		SK 18432002 A3	05-08-2003	
		US 2003180316 A1	25-09-2003	
		ZA 200300755 A	28-04-2004	
		CA 2442865 A1	17-10-2002	
		CZ 20032698 A3	15-12-2004	
		WO 02080965 A2	17-10-2002	
		EP 1390066 A2	25-02-2004	
		HU 0303996 A2	01-03-2004	
		MX PA03008961 A	12-02-2004	
		NO 20034410 A	25-11-2003	
		US 2004202668 A1	14-10-2004	